

1/5/1

DIALOG(R)File 351:Derwent WPI

(c) 2004 Thomson Derwent. All rts. reserv.

012258709

WPI Acc No: 1999-064815/ 199906

XRAM Acc No: C99-019597

**Isolating and purifying polyunsaturated fatty acid ester(s) - comprises a porous particle base e.g. octadecyl-silane**

Patent Assignee: NAGASE SANGYO KK (NAGS ); NAGASE SEIKAGAKU KOGYO KK (NAGS ); SUNTORY LTD (SUNR ); YMC KK (YMCY-N); NAGASE & CO LTD (NAGS ); NAGASE BIOCHEMICAL LTD (NAGS ); YMC CO LTD (YMCY-N)

Inventor: SHIMOMURA Y; SOGO T; TANAKA S; YAGUCHI T; YAMAMURA R

Number of Countries: 022 Number of Patents: 002

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 10310555	A	19981124	JP 97137706	A	19970512	199906 B
WO 9851656	A1	19981119	WO 98IB707	A	19980512	199906

Priority Applications (No Type Date): JP 97137706 A 19970512

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan Pg	Main IPC	Filing Notes
-----------	------	--------	----------	--------------

JP 10310555	A	6	C07C-069/587	
-------------	---	---	--------------	--

WO 9851656	A1 J		C07C-067/56	
------------	------	--	-------------	--

Designated States (National): CN JP KR US

Designated States (Regional): AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE

Abstract (Basic): JP 10310555 A

A method for the isolation and purification of lipid mixtures containing two or more polyunsaturated fatty acids (PUFA) esters using HPLC is new. It comprises using a porous particle base of alkylsilane derivatives especially particle size 10-1000  $\mu$ m and pore sizes 60-3000 Angstrom e.g. octadecylsilane (ODS) derived silica gel.

ADVANTAGE - PUFA esters e.g. docosahexanoic acid (DHA) and docosapentanoic acid (DPA) can be purified effectively and economically.

Dwg.0/0

Title Terms: ISOLATE; PURIFICATION; POLYUNSATURATED; FATTY; ACID; ESTER; COMPRISE; POROUS; PARTICLE; BASE; OCTADECYL; SILANE

Derwent Class: B05; D16; D23; E17

International Patent Class (Main): C07C-067/56; C07C-069/587

International Patent Class (Additional): A23L-001/30; B01D-015/08;

C11B-003/10; C12P-007/64; C12R-001-645

File Segment: CPI

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-310555

(43) 公開日 平成10年(1998)11月24日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	F I
C 0 7 C 69/587		C 0 7 C 69/587
B 0 1 D 15/08		B 0 1 D 15/08
C 0 7 C 67/56		C 0 7 C 67/56
C 1 1 B 3/10		C 1 1 B 3/10
C 1 2 P 7/64		C 1 2 P 7/64

審査請求 未請求 請求項の数 8 F D (全 6 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平9-137706	(71) 出願人 390024442 株式会社ワイエムシィ 京都市下京区五条通烏丸西入醍醐町284番 地
(22) 出願日	平成9年(1997)5月12日	(71) 出願人 000214272 長瀬産業株式会社 大阪府大阪市西区新町1丁目1番17号
		(71) 出願人 591112038 ナガセ生化学工業株式会社 大阪府大阪市西区新町1丁目1番17号
		(74) 代理人 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 多価不飽和脂肪酸エステル分離精製方法

(57) 【要約】

【課題】 ドコサヘキサエン酸 (DHA)、ドコサペン  
タエン酸 (DPA) などの多価不飽和脂肪酸 (PUFA)  
のエステル体を、高効率かつ低コストで、高純度ま  
で精製し得る方法を提供すること。

【解決手段】 多価不飽和脂肪酸エステルを分離精製す  
る方法であって、多価不飽和脂肪酸エステルの2種以上  
を含有する脂質混合物を、高速液体クロマトグラフィー  
(HPLC) によって精製する工程を含む方法。ここ  
で、高速液体クロマトグラフィーは、アルキルシランで  
誘導化された多孔性粒状基材を充填剤として用いる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 多価不飽和脂肪酸エステルを分離精製する方法であって、

多価不飽和脂肪酸エステルの2種以上を含有する脂質混合物を、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）によって精製する工程を包含し、ここで、該高速液体クロマトグラフィーは、アルキルシランで誘導化された多孔性粒状基材を充填剤として用いる、方法。

【請求項2】 前記多孔性粒状基材が、10から1000μmまでの範囲の粒子径、および60から3000オングストロームまでの範囲の細孔径を有する、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 前記多孔性粒状基材が、4%から30%までの範囲の炭素含有率を有するオクタデシルシラン（ODS）誘導化シリカゲルである、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】 前記高速液体クロマトグラフィーが、溶離液としてメタノール、エタノール、またはそのいずれかを80%以上含有する水溶液を用いる、請求項1から3までのいずれかに記載の方法。

【請求項5】 前記脂質混合物が、多価不飽和脂肪酸を産生する微生物の培養菌体抽出物をエステル化することによって得られる、請求項1に記載の方法。

【請求項6】 前記微生物が、ドコサヘキサエン酸（DHA）および／またはドコサペンタエン酸（DPA）を産生する、請求項5に記載の方法。

【請求項7】 前記高速液体クロマトグラフィーによって、95%以上の純度のドコサヘキサエン酸（DHA）エステルおよび／またはドコサペンタエン酸（DPA）エステルが得られる、請求項1から6までのいずれかに記載の方法。

【請求項8】 前記多価不飽和脂肪酸エステルがエチルエステルである、請求項1から7までのいずれかに記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、多価不飽和脂肪酸エステルの分離精製方法に関する。特に、本発明は、ドコサヘキサエン酸（DHA）およびドコサペンタエン酸（DPA）を含む、医薬品および機能性食品の素材として有用な多価不飽和脂肪酸（PUFA）のエステルを、高純度にかつ効率的に分離精製する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】近年、多価不飽和脂肪酸（PUFA）は、特異な生理活性を有する化合物として注目を浴びている。代表的なPUFAとしてα-リノレン酸（ALA）、γ-リノレン酸（GLA）、ジホモγ-リノレン酸（DGLA）、アラキドン酸（AA）、エイコサペンタエン酸（EPA）、ドコサペンタエン酸（DPA）、ドコサヘキサエン酸（DHA）などがある。PU

FAはプロスタグランジン類などの生理活性物質の前駆体であることより研究が進み、様々な生理作用が報告されている。魚油由来のEPAエチルエステルは、約92%の純度の精製品が、閉塞性動脈硬化症を適応症とした医薬品として1990年に市販された。

【0003】一方、DHAは、その生理活性機能としてコレステロール低下作用、抗血液凝固作用、制癌作用、さらには脳代謝系に関連して記憶学習能力の向上作用、老人性痴呆症の予防作用、アルツハイマー疾病の治療作用、稚魚の成長必須因子としての作用などが示されている。そのため、健康食品やベビーミルク等の素材として使用されるとともに、医薬品としての研究が進められている。また、DPAは、生体間でDHAの欠乏に対する代償となることが報告され、何らかの生理活性機能があると考えられている。従って、DPAも医薬品として利用できる可能性がある。なお、DPAには不飽和結合の位置によって（n-3）系と（n-6）系とがあるが、本明細書中で単に「DPA」という場合、（n-6）系のDPAを指す。

【0004】これらのPUFAは、一般に化学合成の困難な化合物である。一方、天然において、これらはトリグリセリドやリン脂質中の脂肪酸残基として存在する。従って従来から、天然の素材からの抽出、精製が行われてきた。例えば、EPAおよびDHAは海産魚の魚油中に含有されており、従来はイワシ油、マグロの眼窩油など、比較的複雑な脂肪酸組成を有する魚油から取り出されていた。

【0005】今後、PUFAを医薬品としての使用に供するためには、少なくとも95%以上の純度、望ましくは98%以上の純度が要求されるといわれる。遊離の脂肪酸の状態では、そのような、試薬や医薬品として適切なレベルの純度にまで精製することは困難である。そのため、エステル体、特にエチルエステルとして精製することが一般的に行われる。

【0006】従来、遊離の脂肪酸またはそのエステル体（以下、-Eで表す）の複数の種類を含む混合物から、特定の脂肪酸を分離するための方法として、主として炭素数の差を利用する蒸留法および超臨界流体抽出法、主として二重結合数の差を利用する低温分別法、尿素添加法、および溶剤分別法その他、イオン交換樹脂によるクロマトグラフィーなどが知られている。これらの方法の組合せによって、90～92%程度までの高純度化は達成できるようになってきた。

【0007】特に、DHAエステル（DHA-E）については、工業的規模での高純度化を指向した方法として、精密蒸留と分取液体クロマトグラフィーとを組み合わせた方法（DHA高度精製抽出技術開発事業研究報告書（平成4～6年度）、p.213、DHA高度精製抽出技術研究組合発行（平成7年11月））の他に、銀イオン交換粘土鉱物を用いる吸着クロマトグラフィー（同報告書、

p. 231; 山口ら、油化学、第40巻、第10号、p. 959(1991))、硝酸銀水溶液中での錯体形成を利用した液相抽出法(同報告書、p. 247; 三澤ら、日本化学会第61春期年会予稿集、p. 1245(1991))などが開発されている。しかしこれらの方法によっても、一回の精製工程によって得られるDHA-Eの純度は、95%程度までであった。より高い純度、例えば医薬品としての使用に適切な98%以上の純度で、DHA-Eや他のPUFAエステルを得るためには、装置、試薬、原料素材などとして特に高価なものを使用したり、複雑な精製操作を組み合わせることが要求された。

【0008】このように従来の精製方法は、工業的な規模において、合理的なコストで、再現性良く、高純度のPUFAエステルを得るためには、満足のいくものではなかった。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、上記問題点の解決を意図するものである。その目的は、DHA、DPAなどのPUFAのエステル体を、高効率かつ低コストで、高純度まで精製し得る方法を提供することにある。

【0010】

【課題を解決するための手段】本発明の方法は、PUFAエステルを分離精製する方法であって、PUFAエステルの2種以上を含有する脂質混合物を、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)によって精製する工程を含む。ここで、高速液体クロマトグラフィーは、アルキルシランで誘導化された多孔性粒状基材を充填剤として用いる。

【0011】上記多孔性粒状基材は、10から1000 $\mu\text{m}$ までの範囲の粒子径、および60から3000オングストロームまでの範囲の細孔径を有し得る。また、上記多孔性粒状基材は、4%から30%までの範囲の炭素含有率を有するオクタデシルシラン(ODS)誘導化シリカゲルであり得る。

【0012】上記高速液体クロマトグラフィーには、溶離液としてメタノール、エタノール、またはそのいずれかを80%以上含有する水溶液を用い得る。

【0013】上記脂質混合物は、PUFAを産生する微生物の培養菌体抽出物をエステル化することによって得られ得る。この微生物は、DHAおよび/またはDPAを産生する微生物であり得る。

【0014】上記高速液体クロマトグラフィーによって、95%以上の純度のDHAエステルおよび/またはDPAエステルが得られ得る。

【0015】

【発明の実施の形態】

(HPLCによる精製)本発明の方法において、HPLCのカラムに用いる充填剤は、アルキルシランで誘導化された多孔性粒状基材である。本発明者らは、アルキル

シランで誘導化された充填剤が、適切な条件下、PUFAエステルの炭素数および不飽和結合数の違いを、従来予測された程度を著しく越えるレベルの精度をもって識別し得ることを発見し、これに基づいて本発明を完成した。

【0016】多孔性粒状基材としては、クロマトグラフィー用基材として適切な任意の基材を用い得る。好ましい基材には、水和酸化金属または水和酸化メタロイドが含まれる。その例としては、水和酸化アルミナ、水和酸化チタニウム、水和酸化ジルコニウム、水和酸化ケイ素、水和酸化スズなどが挙げられる。より具体的には、シリカゲル、ヒドロキシアパタイト、アルミナ、シリカ・アルミナ、チタニア、ケイソウ土、ケイ酸ガラス、アルミノケイ酸塩、クレーカオリン、タルク、ゼオライトなどが例示できる。ガラスビーズ表面にシリカゲル微粒子などをまぶした基材も、ここに含まれる。また、ポリスチレン、ポリメチルメタクリレート、およびそれらの誘導体を含むポリマー粒子も、好ましい基材として用い得る。シリカゲルが特に好ましい。この基材は、粒子径および細孔径が適切な範囲にあるものが選択される。ここで、粒子径および細孔径は、シランで誘導化される前の状態で測定される値をいう。この測定値は、例えば、基材を走査型電子顕微鏡などで観察したときの、粒子の平均値である。

【0017】粒子径の上限は、代表的には1000 $\mu\text{m}$ 、好ましくは300 $\mu\text{m}$ 、より好ましくは100 $\mu\text{m}$ である。粒子径の下限は、代表的には10 $\mu\text{m}$ 、好ましくは20 $\mu\text{m}$ 、より好ましくは40 $\mu\text{m}$ である。粒子径が大きすぎる場合、カラムの分離能が低下する傾向があるため、PUFAエステルを高純度化することが困難になる。粒子径が小さすぎる場合、HPLCにおいて溶離液を輸送する圧力が高くなりすぎるため、PUFAエステルを大量に分取することが困難になり、実用上好ましくない。なお、適切な粒子径は、HPLCに用いるカラムのサイズ(内径×長さ)にも依存して変化することに留意すべきである。

【0018】細孔径の上限は、代表的には3000オングストローム、好ましくは300オングストローム、より好ましくは150オングストロームである。細孔径の下限は、代表的には60オングストローム、好ましくは80オングストロームである。細孔径が大きすぎるか、小さすぎる場合、溶質であるPUFAエステルの拡散、保持挙動を最適化しにくくなる。なお上記の細孔径を有する基材は、一般的に約1~1000 $\text{m}^2/\text{g}$ の範囲内の比表面積を有する。

【0019】多孔性粒状基材は、アルキルシランで誘導化される。アルキルシランの鎖長の上限は、代表的には炭素数40、好ましくは炭素数30、より好ましくは炭素数20である。鎖長の下限は、代表的には炭素数1、好ましくは炭素数8である。炭素数が多すぎると、カラ

ムの分離能が低下する傾向がある。入手の容易さの点から、炭素数18のオクタデシル基を有するオクタデシルシラン(ODS)が特に好ましい。

【0020】多孔性粒状基材のアルキルシランによる誘導化は、当該シランに由来する炭素含有率が適切な範囲になるように行われる。この炭素含有率は、得られた充填剤の疎水性を示す目安となる値であり、一般に元素分析法によって測定される。ポリマーを基材として用いる場合には、誘導化反応の仕込み量に基づいて、化学量論的に算出することができる。炭素含有率の上限は、代表的には30%、好ましくは25%、より好ましくは22%である。炭素含有率の下限は、代表的には4%、好ましくは10%、より好ましくは12%である。炭素含有率が高すぎるか、低くすぎると、カラムの分離能が低下する傾向がある。

【0021】上記の誘導化のための反応は、所望のアルキル基(例えば、トリアコンチル基、エイコシル基、オクタデシル基、オクチル基、n-ブチル基など)を有する適切なシラン化合物(例えば、クロロシラン化合物、アルコキシシラン化合物など)を用いて、公知の方法によって行うことができる。また、粒子径、細孔径、および炭素含有率が上述した適切な範囲にある、オクタデシルシラン(ODS)および他のアルキルシランで誘導化された種々のシリカゲルが、例えば、(株)ワイエムシ社より「YMC\*GEL」の商品名で市販されている。

【0022】HPLCの溶離液としては、逆相クロマトグラフィーに適切な任意の極性溶媒を用い得る。例えば、メタノール、エタノール、イソプロパノール、アセトニトリル、塩化メチレン、クロロホルム、テトロヒドロフラン、これらの組み合わせ、および、これらと水との組み合わせが挙げられる。メタノール、エタノール、またはそのいずれかを80%以上(好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上)含有する水溶液は、好ましい溶離液の例である。溶媒の種類および混合比は、高純度化されるべきPUFAエステルの種類に応じて、適宜選択される。溶離液の最適化は、当業者には容易である。

【0023】例えば、メタノール、またはメタノールを80%以上(好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上)含有する水溶液は、DHA-EとDPA-Eとを、同時に高純度で分取する場合に、好ましい溶離液である。一方、エタノール、またはエタノールの80%以上(好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上)の水溶液は、DHA-Eのみを高純度に分取する場合に、好ましい溶離液である。

【0024】本発明の方法において、充填剤を充填したカラムへの、脂質混合物の一回のチャージ(負荷)量は、脂質混合物中の、高純度化されるべきPUFAエステルの含有量、ならびに、HPLC上で当該エステルと近接した保持時間を示す不要な化合物の含有量などに依

存して決定される。チャージ量は特に限定されるものではないが、通常、カラム容積1リットル当たり、約1gから約10g程度まで可能である。従って、本発明によれば、工業的規模での実施に適用する場合でも十分に実用的な効率で、PUFAエステルを分離精製することができる。

【0025】溶離液の流速など、HPLCの他の操作条件は、当業者により適宜設定される。HPLCの装置としては、市販の適切な装置を利用し得る。工業的規模での実施は、サンプル溶解タンク、サンプル供給タンク、溶出タンク、溶離液回収システムなどを含む適切なプラントを設置して行うことができる。

【0026】カラムからの溶出物の検出には、紫外(UV)検出器、屈折率(RI)検出器など、任意の適切な手段を利用し得る。

【0027】(PUFAエステルを含む脂質混合物の調製)本発明の方法によって、エステル体として分離精製されるPUFAの範囲は、特に限定されない。医薬品または機能性食品としての応用の観点から、天然由来のPUFAが好ましい。特に、炭素数18以上で、不飽和結合3カ所以上を有するPUFAが好ましい。DHA、DPA、EPA、AA、およびGLAは、好ましいPUFAの例である。

【0028】PUFAの供給源も、目的とする脂肪酸を含有するものであれば、特に限定されない。魚油、肝油などの動物油、果実油などの植物油、菌類、藻類などに由来する微生物油などから、目的とする脂肪酸に応じて選択される。例えば、上述のように、DHAおよびEPAは魚油に多く含まれることが知られている。また、DPAはサフラワー油に、GLAは月見草エキスを多く含まれることがそれぞれ知られている。適切な供給源の選択は、当業者には容易である。

【0029】ある種の微生物、特に海洋性の菌類または藻類を培養することによって、DHA、EPA、AAなどの1種以上を含む油脂が得られることが知られている(例えば、特開平7-87988および特開平7-8268、特開平7-75556、および特開平1-304892号を参照)。これらの微生物油脂は、魚油などと比較して脂肪酸組成が単純である場合が多いため、本発明の分離精製方法をより効率的に適用し得る。従って、PUFAを産生する微生物の培養菌体は、好ましい供給源の例である。

【0030】*Thraustochytrium*属および*Schizochytrium*属などの菌は、その菌体中にDHAおよびDPAを含む脂質を蓄積することが報告されている(J. Am. Oil Chem. Soc., Vol.73, No.11, p.1421 (1996))。本発明において、DHAおよび/またはDPAを高純度化する場合、上記微生物および類似する種の微生物の培養菌体を有利に使用し得る。もちろん、培養菌体は例示したものに限らず、DHAまたはDPAを生産する菌種由来であ

れば何れでも良い。

【0031】培養する微生物の種類に応じて、培地組成、温度、pHなどの培養条件が選択される。適切な培養条件の選択は、当業者には容易である。例えば、*Thraustochytrium*属および*Schizochytrium*属は、50%の人工海水を含み、グルコース、コーンステープリカーを基本とした培地を用いた、室温付近の温度、弱酸性のpHの下、好気的条件下での液体培養により、DHAおよびDPAを含む脂質成分を蓄積する。

【0032】微生物の培養菌体を、必要に応じて乾燥し、常法に従い、菌体の粉碎などの操作をした後、脂質を抽出する。動植物油などの他の供給源を利用する場合も、供給源の種類に応じた前処理の後、脂質を抽出することができる。

【0033】このようにして抽出された脂質をエステル化することによって、PUFAエステルを含有する脂質混合物が得られる。PUFAエステルのエステル基は、代表的にはアルキル基である。もっとも、ビニルなどのアルケニル基、フェニルなどのアリール基、およびベンジルなどのアリールアルキル基などでもよい。アルキル基としては、炭素数1から6までのアルキル基が好ましく、炭素数1から4までのアルキル基がより好ましい。ヒトに直接投与する医薬品または機能性食品としては、エチルエステルが特に好ましい。

【0034】エステル化の適切な反応条件は、当業者には公知である。例えば、脂質をヘキサンなどの有機溶媒に溶解した後、アルカリ（例えば1Nの水酸化カリウムを含むエタノール）を添加し、10～25℃程度の温度でエステル化を行うことができる。有機相を分液した後、常法に従って濃縮すれば、エステル体を含む脂質混合物が得られる。

【0035】この脂質混合物を、上述のように、HPLCに供する。本発明の方法によれば、一回のHPLCの操作によって、目的とするPUFAエステルが高純度で得られる。従って、上記のエステル化反応の後、予備的な精製操作を行う必要はなく、直ちにHPLCを行うことができる。

【0036】本明細書中でPUFAエステルの純度とは、HPLCまたはGCの少なくとも一方によって測定される純度をいうものとする。本発明によれば、代表的には95%以上、好ましくは98%以上、より好ましくは99%以上の純度が達成できる。従って、得られたPUFAエステルは、医薬品および機能性食品などの製造に直ちに使用できる。

【0037】

【実施例】以下の実施例により本発明をさらに詳しく説明する。本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0038】なお、以下の実施例において、DHA-EおよびDPA-Eの純度は、高速液体クロマトグラフィ

ー（HPLC）による場合、分析用カラムとして（株）ワイエムシ社製YMC-Pack AM-303を用い、溶離液としてアセトニトリル/水（97.5/2.5；容積比）を流速1ml/分で流通させ、UV（220nm）で検出することによって測定した。一方、ガスクロマトグラフィー（GC）による場合、分析用カラムとして、（株）GLサンエンス社製のキャピラリーカラム、TC-70（直径0.25mm×長さ30m）を用い、キャリアーガスとして窒素ガスを流速：0.8ml/分、100kPa（カラム頭部圧力）で流通させ、カラム温度：170～220℃（4℃/分）の昇温モードにてFIDで検出することによって測定した。

【0039】（実施例1）*Schizochytrium* sp.の培養菌体を乾燥し、クロロホルムとメタノールとの混合溶媒中でガラスビーズを用いて菌体を粉碎し、濾過した後、ヘキサンで抽出することにより、脂質を得た。得られた脂質を、ヘキサン中で、水酸化カリウムを含むエタノールの添加によってエステル化した。常法に従って後処理することにより、脂肪酸のエステル体を含む脂質混合物を得た。この混合物は、GCによる分析から、DHA-Eを約43.7%、DPA-Eを約11.1%含有していた。

【0040】粒子径50μm、細孔径120オングストローム、炭素含有率17%の、オクタデシルシラン（ODS）充填剤（YMC\*GEL ODS-AM-120-S50）を用いた。この充填剤を充填した、内径4.0mm、長さ2000mmのカラムを用いてHPLCを行い、DHA-EおよびDPA-Eを分取した。用いた分取用HPLC装置は、（株）ワイエムシ社製である。溶離液としてメタノールを使用し、4.4リットル/分の流速で通液させた。

【0041】上記の脂質混合物1.42kgを、メタノールの10%溶液として、カラムにチャージした。予め検討した結果に基づく各成分の保持時間を基に、各成分のフラクションを分取した。各フラクションをエバポレータで溶剤を留去し、DHA-EおよびDPA-Eを得た。得られたDHA-Eは0.36kg、DPA-Eは0.07kgであった。

【0042】これらの純度を、HPLCにより分析したところ、DHA-Eは98.9%、DPA-Eは97.7%であった。

【0043】（実施例2）充填剤（YMC\*GEL ODS-AM-120-S50）を充填した内径4.0mm、長さ2000mmのカラムを用いてHPLCを行い、DHA-EおよびDPA-Eを分取した。用いた分取用HPLC装置は（株）ワイエムシ社製である。溶離液としてメタノール/水（98/2；容積比）の混合溶液を使用し、4.4リットル/分の流速で通液させた。

【0044】実施例1と同じ脂質混合物1.33kg

を、メタノールの10%溶液として、カラムにチャージした。各成分のフラクションを分取し、各フラクションをエバポレートして溶剤を留去し、DHA-EおよびDPA-Eを得た。得られたDHA-Eは0.30kg、DPA-Eは0.07kgであった。これらの純度をHPLCにより分析したところ、DHA-Eは99.0%、DPA-Eは99.7%であった。

【0045】(実施例3) 粒子径約20 $\mu$ m、細孔径120オングストローム、炭素含有率17%の、ODS充填剤(YMC\*GEL ODS-A-120-S15/30)を充填した内径6mm、長さ2000mmのカラムを用いてHPLCを行い、DHA-EおよびDPA-Eを分取した。用いた分取用HPLC装置は(株)島津製作所製LC-8Aである。溶離液としてメタノール/水(90/10;容積比)を使用して、1ml/分の流速で通液させた。

【0046】実施例1と同じ脂質混合物480mgを、メタノールの10%溶液として、カラムにチャージした。各成分のフラクションを分取し、各フラクションをエバポレートして溶剤を留去し、DHA-EおよびDPA-Eを得た。得られたDHA-Eは114.2mg、DPA-Eは11.1mgであった。これらの純度をHPLCにより分析したところ、DHA-Eは99.3

%、DPA-Eは99.7%であった。

【0047】(実施例4) 粒子径50 $\mu$ m、細孔径120オングストローム、炭素含有率約13%の、ODS充填剤(YMC\*GEL ODS-AQ-120-S50)を充填した内径6mm、長さ2000mmのカラムを用いてHPLCを行い、DHA-EおよびDPA-Eを分取した。用いた分取用HPLC装置は(株)島津製作所製LC-8Aである。溶離液としてエタノール/水(95/5;容積比)を使用して、1ml/分の流速で通液させた。

【0048】実施例1と同じ脂質混合物80mgを、メタノールの10%溶液として、カラムにチャージした。各成分のフラクションを分取し、各フラクションをエバポレートして溶剤を留去し、DHA-EおよびDPA-Eを得た。得られたDHA-Eは28mg、DPA-Eは5mgであった。これらの純度をHPLCにより分析したところ、DHA-Eは96.5%、DPA-Eは88.9%であった。

【0049】

【発明の効果】本発明の方法によれば、DHA、DPAなどのPUFAのエステル体を、高効率、低コストで、高純度まで精製することができる。

フロントページの続き

(51)Int. Cl.<sup>6</sup>

識別記号

F I

//(C 1 2 P 7/64

C 1 2 R 1:645)

(71)出願人 000001904  
 サントリー株式会社  
 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号  
 (72)発明者 山村 隆治  
 京都府久世郡久御山町田井新荒見69-1  
 株式会社ワイエムシィ分離センター内  
 (72)発明者 下村 泰志  
 石川県小松市国府台5丁目28番 株式会社  
 ワイエムシィ技術開発センター内

(72)発明者 十合 功  
 兵庫県神戸市西区美賀多台7丁目2-9  
 (72)発明者 田中 悟広  
 京都府福知山市長田野町1丁目52番地 ナ  
 ガセ生化学工業株式会社内  
 (72)発明者 矢口 敏昭  
 大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号  
 サントリー株式会社研究センター内